

京都大学	博士 (医学)	氏名	野島 久
論文題目	IQGAP3 regulates cell proliferation through the Ras/ERK signaling cascade. (Ras/ERK シグナル伝達経路を介した細胞増殖における IQGAP3 の解析)		
<p>(論文内容の要旨)</p> <p>体の発生・器官形成において、サイズ制御の理解は基礎生物学的にも、また医学的にも重要な課題である。サイズ決定のメカニズムは栄養摂取等の外的環境因子の影響を受ける一方で、器官の「最終サイズ決定機構」に関する情報が内在的に組み込まれていると考えられるが、その機構は依然として明らかとなっていない。この過程において「contact inhibition of cell growth」の関与が考えられている。contact inhibition of cell growth とは、<i>in vitro</i> の細胞培養において、培養皿の底一面に細胞が増殖し、隣り合う細胞同士の接着が非常に密になると細胞が自ら増殖を止める現象のことであり、この状態を <b>confluent</b> と呼び、細胞は G<sub>0</sub> 期に入る。様々な研究よりこの現象は、培養液中の栄養素の消費や pH の変化により起こるのではなく、細胞が自らの密度を認識するメカニズムが存在するためと報告されている。細胞密度を認識する為に、細胞間接着とその下流のシグナル伝達経路が関わっていると考えられるが、細胞間接着による増殖阻害に係わる膜蛋白質やその裏打ち蛋白質は具体的には明らかにされていない。本研究では <b>contact inhibition</b> の分子機構を明らかにするために、まず上皮細胞における増殖期と休止期の細胞内の情報を得ることが重要と考え、DNA Microarray 法を用いて、マウス乳腺上皮細胞由来の Eph4 細胞における増殖期と休止期の比較を行った。次にその中で変化のあるものに対して、細胞内局在スクリーニングを行い、細胞膜付近に局在するものとして <b>mouse IQGAP3</b> をクローニングした。IQGAP3 の抗体を作成し、IQGAP3 の上皮培養細胞中での局在を観察した結果、細胞のラテラル面に局在することが観察され、また細胞密度の変化に伴う IQGAP3 の発現の変化を mRNA と蛋白質レベルにて調べたところ、IQGAP3 は細胞増殖が止まると共に発現が減少した。蛍光染色法にて観察した結果、IQGAP3 は細胞増殖が行われている細胞の接着面のみが染色されることが観察された。次に RNAi を用いて IQGAP3 をノックダウンし、細胞増殖に与える影響を調べたところ、増殖が著しく抑えられた。このことから、IQGAP3 は細胞増殖に必要不可欠であると示唆された。さらに <b>confluent</b> になり G<sub>0</sub> 期に入った細胞に IQGAP3 を強制発現させると、再び細胞周期が回り始め、またこの効果は MEK のインヒビターである U0126 により阻害された。つまり IQGAP3 は細胞増殖に必要であり、古典的 MAP キナーゼの ERK を介したシグナル伝達が IQGAP3 の下流に存在することが示唆された。そこで、より詳しくシグナル伝達経路を調べたところ、IQGAP3 は活性化型 Ras と強く結合し、不活性化型 Ras とは結合しないことが分かった。これより IQGAP3 が Ras の活性化型に何らかの影響を及ぼしていることが考えられる。そこで IQGAP3 ノックダウン細胞において Ras の活性化状況を調べると、低い状態にあることが分かった。また IQGAP3 ノックダウン細胞に、活性化型 Ras を発現させると細胞増殖が盛んになり、IQGAP3 をノックダウンした表現型がレスキューされた。以上のことから IQGAP3 は Ras/ERK のシグナル伝達経路を活性化することで細胞の増殖を維持しており、その局在から <b>contact inhibition of cell growth</b> に関与することが示唆された。</p>			

(論文審査の結果の要旨)

個体の発生・器官形成において、サイズ制御の理解は重要な課題である。サイズ決定の過程において **contact inhibition** の関与が考えられているが、詳細は不明である。本研究では **contact inhibition** のメカニズムを明らかにするために、上皮細胞における増殖期と休止期の遺伝子発現の量を DNA Microarray 法を用いて検討した。次に変化のあるものに対して、細胞内局在を調べ、細胞膜付近に局在するものとして **IQGAP3** を同定した。細胞密度の変化による発現量の変化を調べたところ、**IQGAP3** は細胞増殖が行われている細胞のみが染色された。次に RNAi にて **IQGAP3** をノックダウン(KD)したところ、増殖が抑えられた。**IQGAP3** は活性化型 Ras と強く結合し、不活性化型 Ras とは結合しなかった。これより **IQGAP3** が Ras の活性化に影響を及ぼすことが考えられた。**IQGAP3-KD** 細胞において Ras の活性化状況を調べると、低い状態にあることが分かった。また **IQGAP3** ノックダウン細胞に、活性化型 Ras を発現させると細胞増殖が盛んになり、**IQGAP3** をノックダウンしたことによる表現型が消失した。以上のことから **IQGAP3** は Ras/ERK のシグナル伝達経路を活性化することで細胞の増殖を維持しており、その局在から **contact inhibition** に関与することが示唆された。

以上の研究は、細胞増殖機構の解明に貢献し、癌化のメカニズム解明にも寄与するところが多い。したがって、本論文は博士 (医学) の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成 20 年 7 月 31 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。

要旨公開可能日： 年 月 日以降